

## Inocula of low water activity with improved resistance to temperature and rehydration, and preparation thereof

**Patent number:** FR2519022  
**Publication date:** 1983-07-01  
**Inventor:** JUNG GERARD; MUGNIER JACQUES  
**Applicant:** RHONE POULENC SA (FR)  
**Classification:**  
- **international:** C05F11/08; C12N1/04; C12N11/04; C05F11/00;  
C12N1/04; C12N11/00; (IPC1-7): C12R1/41;  
C12N11/04; C05F11/08  
- **european:** C05F11/08; C12N1/04; C12N11/04  
**Application number:** FR19810024403 19811229  
**Priority number(s):** FR19810024403 19811229

[Report a data error here](#)

Abstract not available for FR2519022

Abstract of corresponding document: **US4755468**

Inocula having a long storage life and improved resistance to temperature and rehydration and a method of preparing them are disclosed. The method of the invention comprises admixing a culture medium containing microorganisms of the genus *Rhizobium* and at least one carbohydrate source in a polymer gel and then lowering the water activity of the resulting inoculum and maintaining the water activity at less than 0.1.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 81 24403**

---

(54) Préparation d'inoculums à longue viabilité et résistance à la température améliorée et produits ainsi obtenus.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 8) : C 12 N 11/04; C 05 F 11/08 // C 12 R 1/41.

(22) Date de dépôt..... 29 décembre 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 26 du 1-7-1983.

---

(71) Déposant : RHONE-POULENC SA. — FR.

(72) Invention de : Gérard Jung et Jacques Mugnier.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Henri Martin, Rhône-Poulenc Recherches,  
25, quai Paul-Doumer, 92408 Courbevoie.

PREPARATION D'INOCULUMS A LONGUE VIABILITE ET RESISTANCE  
A LA TEMPERATURE AMELIOREE ET PRODUITS AINSI OBTENUS

La présente invention a pour objet un nouveau procédé de  
5 préparation d'inoculum ainsi que les produits obtenus, lesquels  
présentent une longue viabilité et une résistance à la température  
améliorée.

Elle a trait plus particulièrement à un procédé d'inclusion de  
micro-organismes du genre Rhizobium dans une matrice constituée par  
10 un gel de polymère, à des fins agronomiques.

Les micro-organismes du genre Rhizobium ont été décrits comme  
résistants à un état de dessiccation extrême  
(MARSHALL, 1964. Aust. J. Agric. Res. 15, 273-281). Sur ce principe,  
on a proposé de nombreux types d'inoculum.

15 Notamment, HUNT, (1958. J. Bacteriol. 76, 453-454) a proposé une  
méthode de conservation des cellules bactériennes sur des billes de  
porcelaine déshydratées.

Dans l'US 3.034 968, on a proposé un procédé par mise en  
suspension de culture de Rhizobium dans des huiles liquides  
20 déshydratées. La teneur en eau est comprise entre 1 et 10 %, la  
résistance à la température du micro-organisme dans ce type  
d'inoculum est élevée. Dans l'US 3.168 796, on a proposé aussi un  
inoculum constitué d'une suspension de Rhizobium déshydratée dans  
des huiles mélangées à du talc ou du kaolin. Des travaux antérieurs  
25 avaient montré que les microbes en suspension dans une huile liquide  
déshydratée sont capables de survivre et ont une grande résistance  
aux températures (SAVAGE et al, 1922, Food Inv. England ; ROYLE et  
TANNER, 1935 Zents. Bakt. Parasitenk, 2, 436-449 Press. Champaign  
JENSEN, 1945. Microbiology of meats. The Garrard).

30 La lyophilisation, couramment utilisée dans les procédés  
médicaux et agro-alimentaires a été appliquée à la préparation de  
culture de Rhizobium aux USA dès 1944 et en AUSTRALIE dès 1961  
(BERGENSEN, 1981, dans : Methods for evaluating biological nitrogen  
fixation, John Wiley and Sons).

L'atomisation pour déshydrater les cultures de Rhizobium a été aussi appliquée (OCHIN, 1980, Thèse Lille). Dans les deux derniers cas, différentes substances protectrices ou supports sont utilisés (lactose, lait, chlorydrate de cystéine, malto-dextrine, amidon, sucres, talc, plâtre, farine...).

De nombreux procédés proposent des inoculums solides et partiellement déshydratés ayant des teneurs en eau comprises entre 6 - 8 % et 32-38 % (GAULT dans Rhizobium Newsletter, 26, 1981). Ces inoculums sont obtenus par adsorption des cellules de Rhizobium sur des supports divers (tourbe, lignite, vermiculite, argiles, plâtres, farine d'os, éclat de marbre, gel de silice, résidus végétaux...).

Le brevet GB 1.490.046 propose des granulés secs de plâtre sur lesquels sont adsorbés les Rhizobium. FRASER (1975. J. Appl. Bacteriol, 39, 345) décrit une technique de préparation de poudre déshydratée de Rhizobium sur des granulés de gypse. NILSSON (1957 Rev. Sci. Instrum. 11, 212) utilise du sulfate de sodium sans eau pour déshydrater les cellules de Rhizobium par formation d'une eau de cristallisation qui donne  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ .

Cependant la dessiccation est considérée comme un procédé hasardeux du fait d'une mauvaise connaissance des mécanismes de résistance des Rhizobium (GAULT.R dans Newletters, vol. 21 (1) Avril 1981, page 34). Selon VINCENT, (1980, dans Rhizobium Newsletter, 25, 1981) et d'autres auteurs (SALEMA, dans Biological Nitrogen fixation, June 1981 ; STRIJDOM, 1980, Soil Biol. Biochem. 12, 353-356) les étapes conduisant à l'état deshydraté seraient la cause de la destruction du Rhizobium.

C'est pourquoi le concept général suivi consiste à considérer que pour assurer la survie des micro-organismes, il faut conserver dans les inoculums une certaine humidité.

De cette manière, le milieu de culture est apporté sur un support tel que la tourbe, ou dans un gel polymère tel quel où l'on essaie de réduire la perte en eau, ou tout au moins de maintenir une disponibilité de l'eau (ou une activité de l'eau) dans l'inoculum qui renferme, outre le micro-organisme, des éléments minéraux solubles, une source hydrocarbonée telle que mannitol et une source azotée telle que l'extrait de levure.

C'est ainsi que dans l'US 4 155 737, on a proposé l'inclusion dans un gel polymère. Selon ce brevet, le gel polymère peut être constitué par un gel de polyacrylamide ou un gel de silice.

Or, l'on sait que pratiquement le polymère doit être  
5 biodégradable ou tout au moins non polluant.

C'est pourquoi, dans la demande européenne 17 565 au nom de la demanderesse, on a revendiqué de choisir comme support une matrice à base d'au moins un polymère du groupe des polysaccharides, ce procédé se caractérisant par le fait que l'on  
10 fait subir audit polymère un traitement de réticulation au moins partielle.

De plus on a revendiqué dans cette demande d'additionner le gel d'une substance à forte absorption d'eau, telle qu'une silice synthétique ou naturelle.

15 En général, afin de s'assurer d'une bonne survie des micro-organismes, l'on maintient une activité de l'eau à une valeur avantageusement supérieure à 0,85. Mais l'on sait que pour les humidités optimales requises dans les inoculums référenciés dans ces brevets, par exemple pour la survie des Rhizobium, la germination  
20 des spores de champignons et le développement des moisissures et contaminants est à craindre pour des produits non stériles.

Plus généralement pour la plupart des moisissures, l'activité de l'eau limite est comprise entre 0,80 et 0,95 mais on trouve aussi certaines moisissures capables de se développer à des activités de  
25 l'eau plus basses, celles-ci sont dites xérophiles " ou " osmotolérantes " pour désigner l'ensemble des micro-organismes capables de se développer dans un milieu à faible activité de l'eau ( $a_w = 0,6-0,7$ ).

Il est donc nécessaire pour assurer la stabilité microbiologique des inoculums, pour une teneur en eau optimale, de  
30 préparer et de stocker les inoculums stérilement ou d'assurer leur conservation au froid ; la stabilité des inoculums réfrigérés résulte à la fois de l'abaissement de la température et du blocage d'une fraction d'eau disponible pour les contaminants ; l'intégrité de l'inoculum est respecté, mais au prix des lourdes contraintes de  
35 la chaîne de froid.

En règle générale, ces inoculums demeurent fragiles vis-à-vis des contaminants et résistent mal au-delà d'une quarantaine de

degrés, ce qui est un inconvénient dans les pays chauds, ou de manière générale, lors de la conservation du fait d'un risque certain de contamination.

La présente invention a également pour objet un produit  
5 présentant une structure souple facilitant sa mise en oeuvre, et son stockage.

Pour cela, pour maîtriser les différents processus de dégradation : développement de micro-organismes, réactions chimiques, réactions enzymatiques, altération de la texture, on peut  
10 agir plus ou moins sélectivement sur chacun de ces phénomènes en jouant sur les paramètres habituels de la physico-chimie, température, pH, potentiel redox, utilisation d'inhibiteurs spécifiques.

Mais ces moyens se sont avérés limités. Ceci vient en particulier du fait que comme souligné précédemment, l'enseignement  
15 de l'art antérieur repose sur le principe que l'eau disponible doit être suffisante pour assurer la survie du micro-organisme.

Dans les inoculums décrits dans l'art antérieur, on n'atteint pas une valeur singulière de l'activité de l'eau permettant leur stockage sans précautions particulières du fait que l'on se situe à  
20 des valeurs de 0,5 au mieux. Ce qui est suffisant, pour éviter la contamination mais insuffisant pour empêcher la destruction des micro-organismes.

L'objet de la présente invention est la préparation d'inoculums stables au cours du temps en les rendant aptes à un stockage  
25 prolongé ne nécessitant ni traitement thermique, ni stérilisation particulière, ni réfrigération, ni agent de conservation.

Dans la présente invention, on décrit un moyen privilégié pour conserver les inoculums en modifiant la disponibilité de l'eau, exprimée en terme d'activité de l'eau, sans détruire les  
30 micro-organismes.

Des travaux importants de la demanderesse ont mis en évidence que partant des valeurs habituelles de l'activité de l'eau dans les inoculums, de l'ordre de 0,85 et plus, si l'on abaissait l'activité de l'eau, il y aurait bien, dans un premier temps, diminution du  
35 développement des moisissures et des réactions enzymatiques, mais que l'on observait une plasmolyse importante des cellules, et des réactions de brunissement.

Mais on a observé que, de manière surprenante, si l'on

continuait à abaisser l'activité de l'eau, ces inconvénients disparaissaient et que, contrairement à ce que laissait supposer l'état de l'art, la survie des micro-organismes était assurée.

Le concept de l'invention consiste à extraire du produit la fraction d'eau la plus disponible et à utiliser les caractéristiques de mélange gel et substances solubles associées, agissant comme des solutés ou des humectants, de préférence dans le domaine des très faibles activités de l'eau. La valeur de cette activité dépend notamment des conditions du milieu et de la nature du micro-organisme.

On peut admettre que d'une manière générale, pour les valeurs minimales de l' $a_w$ , on conserve un nombre maximum de cellules viables.

Les différentes valeurs de l'activité de l'eau sont obtenues et déterminées par la méthode dite des solutions aqueuses saturées (Multon 1981 Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires - APRIA -).

Le procédé selon l'invention se caractérise donc par le fait que le séchage est suffisant pour abaisser l'activité de l'eau dans l'inoculum en dessous de celle de la valeur critique soit généralement à une valeur inférieure à 0,5 et de préférence de moins de 0,3 et avantageusement en dessous de 0,1 que l'on maintient cette valeur lors du stockage contrairement aux procédés de l'art antérieur qui décrivent un séchage conduisant à un produit qui en fait reste dans la zone léthale.

Les différentes valeurs optimales de l'activité de l'eau pour la protection du micro-organisme dépendent notamment de la température, de la nature du micro-organisme, de la nature et de la concentration des composés présents, et du type de polymère utilisé.

La connaissance de la vitesse de destruction des micro-organismes à la température est un paramètre nécessaire pour la mise au point de procédés de préparation très sûrs pour un inoculum. Les travaux de la demanderesse ont montré que la résistance des micro-organismes dans les inoculums aux températures élevées (60°C) était maximale pour les valeurs de l'activité de l'eau les plus faibles et que la perte de la survie intervenait rapidement à ces mêmes températures quand ces valeurs allaient vers 0,5.

Les travaux de la demanderesse ont également montré que la

vitesse de destruction des micro-organismes aux activités de l'eau intermédiaires de l'ordre de 0,4-0,8 est fonction de la source hydrocarbonée du milieu de culture.

5 On peut avancer l'hypothèse selon laquelle la survie des micro-organismes est sous la dépendance de la disponibilité de l'eau qui jouerait le rôle de réactif en mettant en solution les composés solubles ou partiellement solubles présents dans le milieu.

La mobilité de ces composés, par suite de phénomène d'osmose, entraînerait la destruction des micro-organismes.

10 Les travaux de la demanderesse ont, en plus, montré que l'évolution des isothermes de sorption des inoculums, et par là l'activité de l'eau, était modifiée par le mode d'obtention de l'isotherme (phénomène d'hystérésis), par la température, par la nature et la concentration des sources hydrocarbonées et des substances  
15 solubles du milieu de culture, par la modification du milieu de culture par le micro-organisme, par les phénomènes de cristallisation des composés cristallisables présents.

Ces travaux ont montré, en outre, les caractéristiques spécifiques d'hygroscopicité de différents polymères utilisés selon  
20 leur nature ou leur mode d'obtention.

On a aussi pu montrer que l'inoculum polymère peut être associé à un produit toxique tel qu'un pesticide sans destruction des micro-organismes si l'inoculum polymère est placé à de très faibles activités de l'eau, notamment en dessous des seuils de démarrage de  
25 réactions hydrolytiques.

On voit donc que selon l'invention, le concept de l'activité de l'eau, qui doit être pris en considération, englobe les phénomènes où l'eau intervient, soit comme réactif chimique, soit comme élément structural et permet de réaliser une protection des inoculums très  
30 simplement par ajustement et maintien de l'activité de l'eau, à un seuil optimal sans préjuger de la manière dont cet ajustement est effectué, et de maîtriser le devenir des micro-organismes inclus dans les polymères.

Selon l'invention, le milieu de culture renferme au moins une  
35 source hydrocarbonée. Celle-ci est telle que du groupe des sucres, des polyols et des polysaccharides. On peut citer par exemple comme source hydrocarbonée le mannitol, le glycérol, le glucose, la dextrine, l'amidon.



Le milieu de culture renferme également une source azotée minérale organique telle que l'extrait de levure.

Le milieu de culture renferme également avantageusement au moins un sel minéral.

5 Selon l'invention, on prépare d'abord un milieu de culture renfermant une source hydrocarbonée (sucre, polyalcool, polysaccharide...) que l'on ensemence avec le micro-organisme.

La concentration bactérienne peut être augmentée par centrifugation préalable du milieu de culture, et remise en  
10 suspension du culot bactérien.

Le milieu de culture ou la suspension bactérienne est ensuite apporté à un gel de polymère dans lequel le micro-organisme est inclus, puis le gel est séché.

Ce séchage peut se faire de diverses manières, en une ou  
15 plusieurs étapes. Toutefois, l'on doit éviter de faire appel à une technique qui entraîne la destruction du micro-organisme.

Selon l'invention, un simple contact à l'air dans les conditions habituelles de température et d'humidité relative n'est pas suffisant.

20 L'on doit faire appel à des techniques qui permettent d'obtenir une dessiccation plus poussée telles que :

- flux d'air chaud et sec, évidemment dans les conditions compatibles avec la survie du micro-organisme.

- solution saturée, en un composé présentant l'activité de  
25 l'eau requise, évoluant vers l'équilibre avec l'inoculum.

Par ailleurs, on peut apporter l'inoculum sur un support tel que à base de silice.

On peut en particulier utiliser une silice obtenue par précipitation d'une solution de silicate par un agent acidifiant et  
30 à surface spécifique BET comprise entre 50-600 m<sup>2</sup>/g, comme décrit dans les FR 2 159 580 au nom de la demanderesse.

On peut en particulier faire appel à une technique de séchage par atomisation, qui, de manière inattendue, conduit à des inoculums dans lesquels la survie du micro-organisme est préservée alors même  
35 que les températures des gaz de traitement sont largement supérieures à celles que le micro-organisme peut subir.

Dans ce cas éventuellement, la réticulation du polymère peut être provoquée par le traitement thermique lors du séchage.

Bien évidemment, on peut combiner plusieurs de ces techniques.

Dans le cas où l'on fait appel à une méthode impliquant un absorbant tel que silice, cet absorbant peut en plus remplir une fonction de support et charge inerte, facilitant la mise en oeuvre et la manipulation de l'inoculum.

Le polymère utilisé est avantageusement du groupe des polysaccharides auquel on fait subir un traitement de réticulation au moins partiel.

Par traitement de réticulation au moins partiel, on entend un traitement susceptible de modifier la structure du polysaccharide, tel que traitement thermique, traitement par un sel métallique ou de synergie au moyen d'un autre polymère et de préférence par un autre polysaccharide.

Le sel métallique est tel que le fer, d'aluminium ou de calcium.

Avantageusement le polymère est à base d'un hétéro-polysaccharide à haut poids moléculaire obtenu par fermentation d'un hydrate de hydrocarboné par un micro-organisme du genre Xanthomonas ou Arthrobacter ou des champignons appartenant au genre Sclerotium.

On peut également faire appel à des polymères issus de gommes naturelles ou biosynthétiques, de provenance diverses : algues (alginates, carraghénanes, agar), exsudats de plantes (gommes karaya, adragante, arabique) et de graines (guar, caroube).

Comme dit précédemment, on ajoute un milieu de culture ou une suspension de micro-organismes dans la solution de polysaccharide et l'on réalise la réticulation au moins partielle du ou des polysaccharides.

On peut aussi, selon une autre forme de mise en oeuvre, dissoudre le polysaccharide dans le milieu de culture.

Les polymères peuvent se présenter sous diverses formes : gels, billes, fibres.

Avantageusement, on cherche à assurer la stabilité des inoculums obtenus et à les présenter sous forme de poudre ou microgranulés pour faciliter leur mise en oeuvre.

La limitation des transferts d'eau entre l'inoculum polymère à faible activité de l'eau et l'atmosphère environnante doit être réalisée par le choix d'un mode d'emballage adapté.

La caractéristique principale de l'emballage sélectionné est son imperméabilité à la vapeur d'eau. Cela suppose que l'emballage ait été parfaitement réalisé, c'est-à-dire qu'il ne présente ni microporosité, ni microcanaux de fuite aux soudures. Dans l'emballage, il s'établit un équilibre de pression d'eau entre l'atmosphère interne et l'inoculum ; une fois l'équilibre atteint, la capacité d'absorption d'eau de l'inoculum devient négligeable (rapport kg d'air / kg de produit très faible). Pour le type de protection que l'on veut assurer, les films de polypropylène correspondent à un matériau d'emballage approprié tel que Pryphane commercialisé par R.P.Films. Les films de polypropylène assurent une bonne stabilité thermique (non conductivité, non réflectivité), une faible transmission de la lumière, une bonne perméabilité aux gaz.

Il est possible d'associer un déshydratant dans le sachet d'emballage.

Comme déjà dit, avantageusement on fait appel à des polymères à base de polysaccharides qui vont influencer sur le devenir du micro-organisme dans le sol suite à l'inoculation :

- la taille des particules de polymère permet la meilleure dissémination des Rhizobium.

- la poudre de polysaccharide se réhumidifie rapidement ;

- le polysaccharide se lie aux particules de sols et autres substrats et aux racines ;

- le polysaccharide est rapidement dégradé dans le sol, les Rhizobium sont libérés de leur matrice de polymère et infectent les racines de la légumineuse.

Mais on ne sortirait pas du cadre de la présente invention en faisant appel à une autre matrice polymère telle que polyacrylamide, gel de silice ou autre.

Mais la présente invention sera plus aisément comprise à l'aide des exemples suivants, donnés à titre indicatif mais nullement limitatif.

L'inoculum selon l'invention peut être amené par une méthode d'inoculation du sol ou par préenrobage des graines, comme décrit dans le FR 79 28956.



de culture après incubation (6 jours) est de l'ordre de  $2-3 \cdot 10^9$  avec le mannitol ou les différentes sources carbonées utilisées.

On prépare deux solutions (les valeurs sont données pour la préparation de 300 g d'inoculum).

- 5 a) Solution de polysaccharide de type anionique résultant de la fermentation d'hydrates de hydrocarboné par un micro-organisme de genre Xanthomonas de  $PM > 2 \cdot 10^6$ , que l'on désignera par produit 1.

On amène 100 ml d'eau distillée à  $70-80^\circ\text{C}$ , on ajoute 1,5 g du produit 1, on maintient cette température 20 à 30 minutes, sous  
10 agitation puis on le ramène entre  $40$  et  $50^\circ\text{C}$ .

- b) Solution de farine de graine de caroube = polysaccharide constitué d'unités  $\beta$  -D - manno pyranosyl (liaisons 1 4) une sur quatre ou cinq étant substituée en  $\text{C}_6$  par un  $\alpha$  - D - galacto-pyranosyl  $PM = 3,1 \cdot 10^5$  que l'on désignera par la  
15 suite par produit 2.

On procède de la même façon en remplaçant le produit A par 1,5 g de farine de graine de caroube (produit 2).

Lorsque les deux solutions sont à  $40-45^\circ\text{C}$ , on ajoute, sous agitation, à chacune d'elle, 50 ml de la culture bactérienne. On  
20 verse alors, en agitant vigoureusement au le mélange culture + polysaccharide dans le mélange culture + farine de graine de caroube. L'obtention d'un gel consistant est instantanée si les deux solutions sont mélangées vigoureusement.

#### 2°) Préparation d'un inoculum polymère Xanthane (Fibres)

25 On obtient deux inoculums :

- un inoculum G Xanthane  $\text{AlCl}_3$ , si on utilise pour la préparation des fibres,  $\text{AlCl}_3$  et le sorbitol comme complexant.

- ou un inoculum H, Xanthane  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  si on utilise pour la préparation des fibres  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  et le Sorbitol comme complexant.

30 Mode de préparation de l'inoculum G

On disperse 1 g de produit 1 dans 100 ml de culture bactérienne.

D'autre part, on dissout 0,482 g de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) dans 20 ml d'une solution aqueuse de sorbitol (agent séquestrant de l'aluminium) à 5 % de concentration. On neutralise la  
35 solution aluminique résultante au moyen d'une solution aqueuse normale de soude, ce qui conduit à une solution limpide de nitrate basique d'aluminium à  $\text{pH} = 4$ . On ajoute au gel de polysaccharide,

sous agitation une solution basique d'aluminium. On observe un épaississement et la séparation d'une solution aqueuse fluide ne contenant plus de polysaccharide. On essore le solide formé, on le lave avec de l'eau, et enfin, on le sèche.

- 5 On peut remplacer  $\text{AlCl}_3$ ,  $6\text{H}_2\text{O}$  par  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  (inoculum H).  
On peut remplacer le sorbitol par du glycerol.

3°) Préparation d'un inoculum polymère alginate  $\text{CaCl}_2$   
(billes ou fibres)

- 10 On obtient un inoculum I alginate- $\text{CaCl}_2$  si on utilise la méthode de préparation des fibres et le mannitol comme source du milieu YEM.

Trois étapes sont nécessaires.

- a) Préparation de la suspension de Rhizobium dans l'alginate.

- 15 On dissout dans 100 ml de culture bactérienne 2 g d'alginate de sodium faible viscosité (130-240 cps).

- 20 b) Gélification. On fait tomber la suspension de Rhizobium dans l'alginate dans une solution de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (170 g/l). La gélification se fait en billes si l'on fait tomber goutte à goutte la suspension dans la solution de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en agitant cette solution. La gélification se fait en fibres si l'on verse 20 ml de la solution de  $\text{CaCl}_2$ , sous agitation, dans la solution d'alginate.

- c) Lavage. Aussitôt après la gélification, on lave l'inoculum polymère en billes (ou en fibres), dans l'eau courante.

4°) Préparation d'un inoculum polymère alginate  $\text{CaSO}_4$  (gel)

- 25 On obtient un inoculum J alginate  $\text{CaSO}_4$  si on utilise le mannitol comme source carbonée du milieu YEM.

Deux étapes sont nécessaires :

- 30 a) Préparation de la suspension de Rhizobium dans un alginate de viscosité comprise entre 750 et 1000 cps. On dissout dans 80 ml de culture bactérienne 1 g d'alginate. Pour cela, on disperse la poudre en pluie fine sur la culture en l'agitant continuellement jusqu'à solubilisation complète de l'alginate.

- b) Gélification

- 35 On ajoute à la suspension de Rhizobium dans l'alginate 20 ml d'une solution de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à 6 g/l. La prise en masse du gel est instantanée.

Comme dit précédemment le séchage est un point important  
puisque les modes de séchages utilisés dans l'art antérieur pour la  
survie des micro-organismes tels que Rhizobium japonicum  
conduisaient à des valeurs trop élevées de l'activité de l'eau, ou à  
5 la destruction des micro-organismes lors de ce séchage.

Dans les exemples suivants, on a réglé l'activité de l'eau au  
moyen de solutions saturées dont les valeurs des activités de  
l'eau à une température de 25°C sont exposées dans le tableau 1.

10

15

20

25

30

35

TABLEAU I

	SOLUTES		
5	(Solutions saturées)	25°C	
	NaOH	0,0695	
10	$\text{K}_2\text{H}_3\text{O}_2 (1,5 \text{ H}_2\text{O})$	0,226	
	$\text{MgCl}_2$	0,3273 0,332	
	$\text{CrO}_3$	0,396	
15	$\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,438 0,4276	
	$\text{Mg} (\text{NO}_3)_2$	0,5288	
20	$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	0,535	
	NaBr	0,5770	
	$\text{CuCl}_2$	0,886	
25	$\text{NaNO}_3$	0,7373	
	NaCl	0,7532	
30	KCl	0,8432	
	$\text{KNO}_3$	0,920	
	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,927	
35			



On a illustré dans les divers tableaux et courbes l'influence d'un certain nombre de paramètres.

Figure 1 : Elle représente les isothermes de sorption des inoculums B (tracé 1), I (tracé 2), A (tracé 3) et d'inoculums constitués de cellules de Rhizobium lyophilisées (tracé 4), de cellules de Rhizobium déshydratées sous vide (tracé 5) et d'un inoculum sur tourbe (tracé 6) (25°C).

Les petites flèches montrent le phénomène de cristallisation du mannitol.

Figure 2 : Elle représente les isothermes adsorption-désorption de l'inoculum A et illustre le phénomène d'hystérésis (25°C).

Figure 3 : Elle illustre les isothermes de sorption de l'inoculum A (tracé 1) et les isothermes de sorption du même inoculum mais sans cellules bactériennes (milieu YEM non modifié) (tracé 2) et avec le milieu de culture partiellement éliminé (inoculum lavé) (tracé 3) (25°C). Cette figure illustre l'influence que peut avoir le milieu de culture sur l'évolution des isothermes de sorption.

Figure 4 : Elle illustre les isothermes de sorption du même inoculum A mais à deux températures différentes (tracé 1 : 4°C et tracé 2 : 25°C).

Figure 5 : Elle représente les isothermes de sorption du même inoculum A (tracé 1) et les isothermes de sorption des graines de soja (tracé 2) et des graines de soja préenrobées (tracé 3) (25°C).

Figure 6 : Elle illustre l'isotherme de sorption du même inoculum A et montre l'évolution de l'activité déshydrogénasique en fonction de l' $a_w$  (TPF = Triphénylformazan réduit) (25°C).

Figure 7 : Elle illustre le phénomène de réaction de brunissement (type réactions de Maillard) dans l'inoculum J (tracé 1) et dans l'inoculum A (tracé 2) après 300 jours de stockage à 25°C.

Figure 8 : Elle montre l'effet de la température (55°C) sur la survie des Rhizobium au cours du stockage dans l'inoculum A (fig. 8 A) et l'inoculum B (fig. 8 B) en fonction de l' $a_w$  (tracé 1,  $a_w = 0,09$  ; tracé 3,  $a_w = 0,22$  ; tracé 4,  $a_w = 0,32$  ; tracé 5,  $a_w = 0,43$  ; tracé 6,  $a_w = 0,52$ ).

Figure 9 : Elle illustre l'effet de la source carbonée du milieu de culture sur la survie du Rhizobium dans l'inoculum A (mannitol) (tracé 1) et dans l'inoculum B (glycérol) (tracé 2) après 40 jours de stockage (28°C).

Figure 10 : Elle montre la survie du Rhizobium dans l'inoculum G (tracé 1) et dans l'inoculum H (tracé 2) après 30 jours de stockage (28°C).

Figure 11 : Elle représente les courbes de survie du Rhizobium dans l'inoculum A en fonction de l' $a_w$  après différents temps de stockage (25°C) (tracé 1 : 10 j ; tracé 2 : 20 j ; tracé 3 : 30 j ; tracé 4 : 80 j ; tracé 5 : 110 j ; tracé 6 : 180 j).

Figure 12 : Elle illustre la survie du Rhizobium au cours du stockage de l'inoculum A (.) et de l'inoculum J (.) en fonction de différentes  $a_w$  (28°C).

Figure 13 : Elle illustre les courbes de survie du Rhizobium dans les inoculums A, B, C, D, E et F en fonction de l' $a_w$  après 10 jours de stockage (28°C) et met en évidence l'effet de différentes sources carbonées de poids moléculaires différents sur la vitesse de destruction des Rhizobium.

Figure 14 : Elle représente les courbes de survie de trois souches de Rhizobium inclus dans le polymère A après 10 jours de stockage (28°C) (tracé 1 Rhizobium Japonicum USDA 138 Beltsville ; tracé 2 Rhizobium meliloti 2011, INRA DIJON ; tracé 3, Rhizobium phaseoli souche Olivia Université Minnesota, USA).

Figure 15 : Elle représente les courbes de survie du Rhizobium japonicum dans l'inoculum A pour les graines de soja (ex. Kingsoy) pré-enrobées en fonction de l' $a_w$  et à deux températures (tracé 1, 28°C ; tracé 2, 4°C) après 60 jours de stockage.

TABLEAU 2 : Il représente le pourcentage de germination des graines de soja pré-enrobées avec l'inoculum A et stockées à différentes  $a_w$  (28°C) et le nombre de nodules par plante.

TABLEAU 2

5	:	:	:	:
	:	$a_w$ des graines :	% de germination :	Nombre de nodules :
	:	pré-enrobées :	par rapport au :	/ plantule :
	:	(1) :	témoin :	(2) (3) :
10	:	:	:	:
	:	0.09 :	87.09 :	18.66 :
	:	:	:	:
	:	0.31 :	90.32 :	15.66 :
	:	:	:	:
15	:	0.51 :	83.87 :	3.90 :
	:	:	:	:
	:	0.76 :	0 :	- :
	:	:	:	:
	:	0.93 :	moisissures :	- :
20	:	:	:	:
	:	:	:	:
	:	Témoin, graines :	100 :	0 :
	:	enrobées :	:	:
25	:	:	:	:
	:	Inoculum liquide:	92,64 :	18,32 :
	:	:	:	:

30 (1) durée de stockage des graines pré-enrobées aux différentes

$a_w$  : 6 mois.

(2)  $a_w$  des graines pré-enrobées (soja cv. Kingsoy) cultivées en vases de végétation (1 kg de sol) : 30 jours.

(3) nombre moyen de déterminations effectuées par  
35 traitement : 10

Rhizobium japonicum : USDA 138

TABLEAU 3 : Il illustre l'effet de deux fongicides thiram = disulfure de bis (biméthyl-thiocarbamyl) et éthyl phosphite d'aluminium associés à l'inoculum A sur la survie du Rhizobium placé à différentes  $a_w$ .

TABLEAU 3

	:		:	Log du nombre de <u>Rhizobium</u> /g	:
	:	TRAITEMENTS	:	après 30 jours de stockage (25°C)	:
10	:		:	Activité de l'eau	:
	:		:	0,06 : 0,22 : 0,39 : 0,43 : 0,52 : 0,75	:
	:	Inoculum A	:	:	:
	:	sans thirame	:	7,82 : 7,74 : 7,43 : 7,39 : 0	0 :
15	:		:	:	:
	:	Inoculum A	:	:	:
	:	avec thirame	:	:	:
	:	dans les propor-	:	8,83 : 8,62 : 8,04 : 7,97 : 5,65	0 :
	:	tions (1/2)	:	:	:
20	:	Inoculum A	:	:	:
	:	Anyl éthyl	:	8,81 : 0 : 0 : 0 : 0	0 :
	:	phosphite	:	:	:
	:	d'aluminium (1/1)	:	:	:

25

Thiram (Rhodiasan R.P.) Disulfure de bis (biméthyl-thiocarbamyl)  
m.a. 90 % - solubilité : 30 ppm.

Log du nombre de Rhizobium /g d'inoculum avant stockage : 9,04

30

35

TABLEAU 4 : Il représente la limitation des phénomènes de transferts d'eau des graines de soja pré-enrobées avec l'inoculum A par l'utilisation de sachets de polypropylène. Cet exemple est donné à titre illustratif, les graines de soja sont généralement conservées à 11 % d'humidité ( $a_w$  0,5 ~ 0,6).

TABLEAU 4

10	:	:	Humidité des graines * au cours du	:
	:	:	stockage à une humidité relative de	:
	:	:	l'atmosphère de 92.2 %	:
	:	TRAITEMENTS	(g H <sub>2</sub> O/100g m.s 105°C)	:
15	:	:	Durée de stockage (jours)	:
	:	:	:	:
	:	:	4	12
	:	:	:	:
	:	Graines non	10,58	11,46
20	:	ensachetées	:	:
	:	:	:	:
	:	Graines ensache-	:	:
	:	tées dans les	:	:
	:	films de polypro-	:	:
25	:	pylène référence	:	:
	:	Pryphane **	:	:
	:	25 SCBT	5,95	5,98
	:	30 SCBT	6,01	5,91
	:	40 SCBT	5,90	5,95
30	:	:	:	:

\* Humidité initiale des graines : 5,46 g H<sub>2</sub>O/100 g m.s. 105°C

\*\* Epaisseurs respectives des films utilisés : 25 , 30  
et 40  $\mu$ .

Enfin on a séché les inoculums A et J dans un atomiseur tel que décrit dans l'ouvrage de Masters Spray Drying - second édition - John Wiley & Sons 1976 -, en mettant en oeuvre un atomisateur à turbine.

5        En utilisant une température de sortie de 75°C et en faisant varier la température d'entrée entre 150 et 250°C, on a pu constater que le log n Rhizobium vivant par gramme de poudre atomisée demeurait stable et égal à la valeur de départ. Il n'y a donc pas destruction du Rhizobium et l'on peut obtenir une présentation en  
10    poudre.

15

20

25

30

35

## REVENDEICATIONS

1°) Procédé de préparation d'inoculum à longue viabilité et à résistance à la température améliorée par inclusion d'un micro-organisme apporté par un milieu de culture, dans un gel de polymère, caractérisé par le fait que l'on abaisse l'activité de l'eau dans l'inoculum en dessous de sa valeur critique à une valeur inférieure à 0,5 et qu'on le maintient à cette valeur.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on abaisse l'activité de l'eau dans l'inoculum en dessous de 0,3 et de préférence en dessous de 0,1.

3°) Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé par le fait que l'activité de l'eau dans l'inoculum est abaissé en effectuant un séchage par atomisation.

4°) Procédé selon la revendication 1 et 2, caractérisé par le fait que l'activité de l'eau dans l'inoculum est abaissé au moyen d'une solution saturée en un composé présentant l'activité de l'eau requise.

5°) Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que l'inoculum est apporté sur un support à base de silice.

6°) Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que le support est constitué par une silice précipitée de surface BET comprise entre 50 et 600 m<sup>2</sup>/g.

7°) Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait que le polymère est du groupe des polysaccharides auquel on fait subir un traitement de réticulation au moins partiel.

8°) Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé par le fait que le milieu de culture renferme une source hydrocarbonée telle que du groupe des sucres polyols et polysaccharides.

9°) Procédé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que la solution hydrocarbonée est du groupe du mannitol, glycérol, glucose, dextrine, amidon.

10°) Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé par le fait que le milieu de culture renferme une source azotée minérale ou organique telle que l'extrait de levure.

11°) Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé par le fait que le milieu de culture renferme au moins un sel minéral.

12°) Inoculum obtenu en mettant en oeuvre le procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé par le fait qu'il  
5 comprend un micro-organisme inclus dans un gel polymère, une source hydro-carbonée, une source azotée et au moins un sel minéral.

13°) Inoculum selon la revendication 12 caractérisé par le fait que le polymère est du groupe des polysaccharides au moins  
10 partiellement réticulé, que la source hydrocarbonée est du groupe du mannitol, du glycérol, glucose, dextrine, amidon et que le micro-organisme est un Rhizobium.

14°) Application de l'inoculum selon l'une des revendications 11 et 13 au préenrobage des graines.

15°) Application de l'inoculum selon l'une des revendications  
15 12 et 13 à l'inoculation du sol.

20

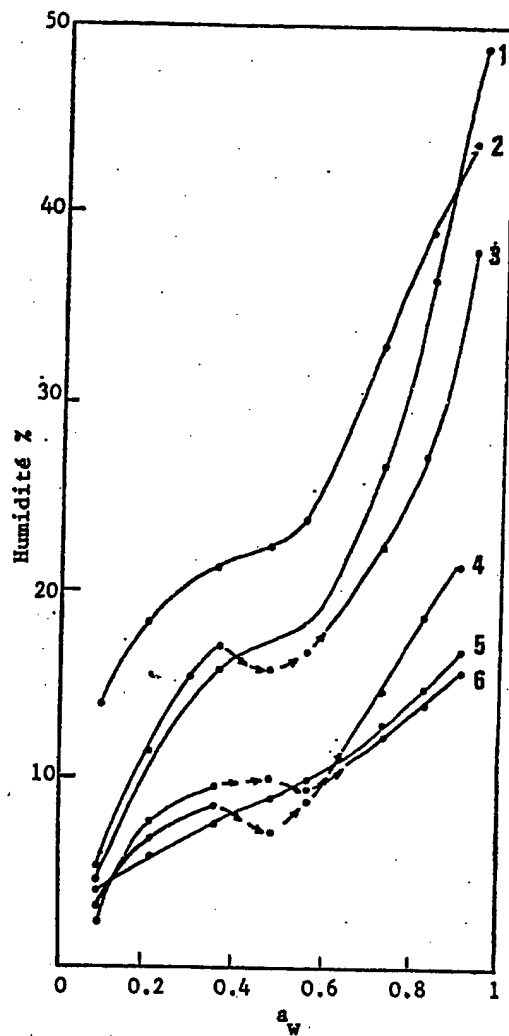
25

30

35



FIG 1



2519022

FIG 2

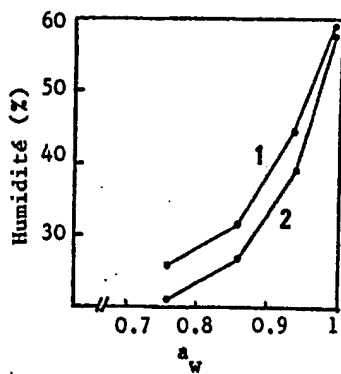


FIG 3

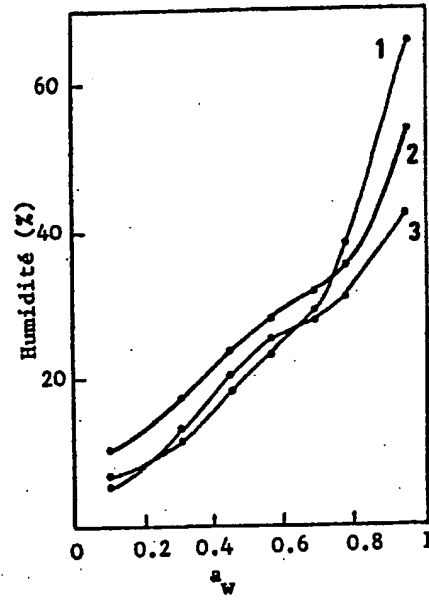


FIG 4

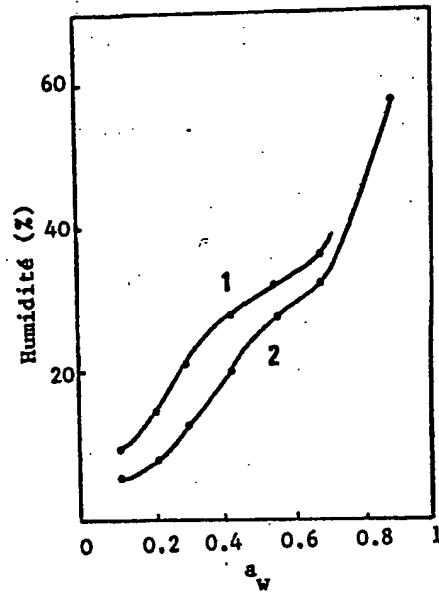
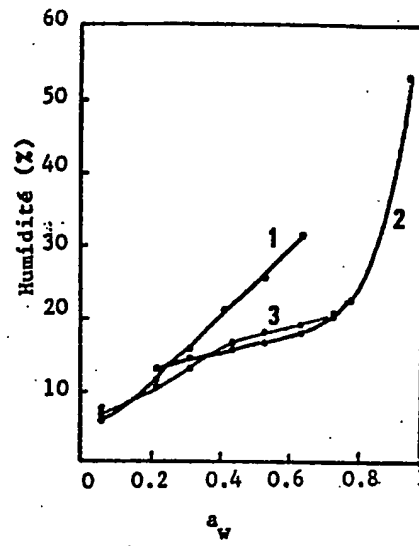


FIG 5



2519022

FIG 6

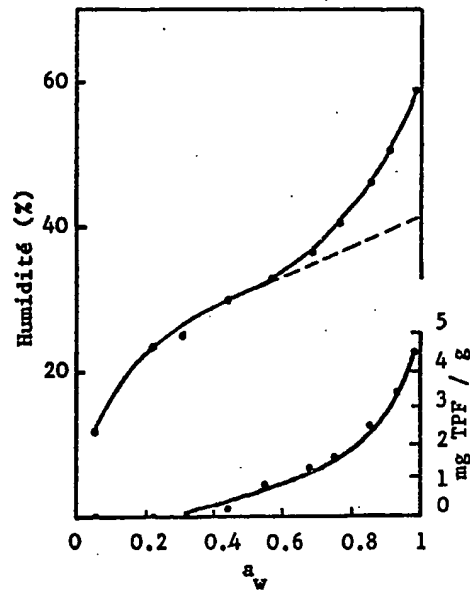


FIG 7

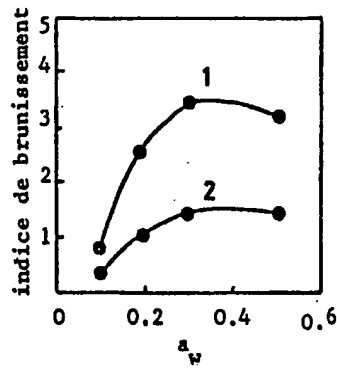


FIG 8

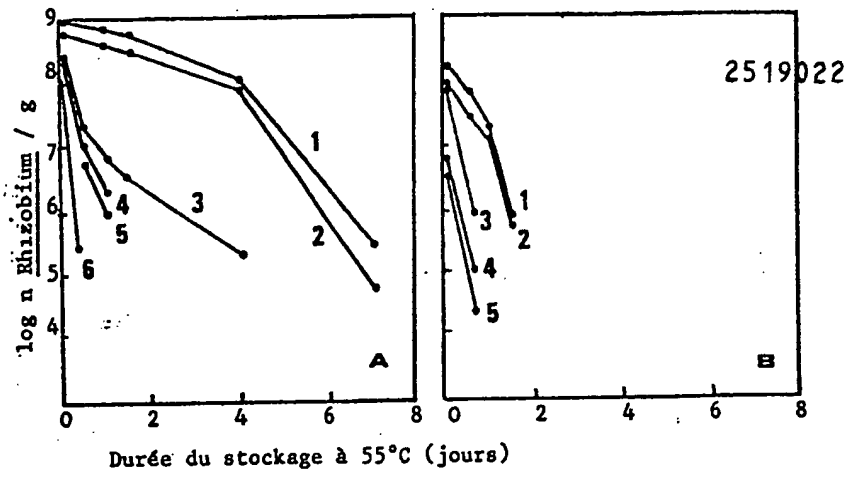


FIG 9

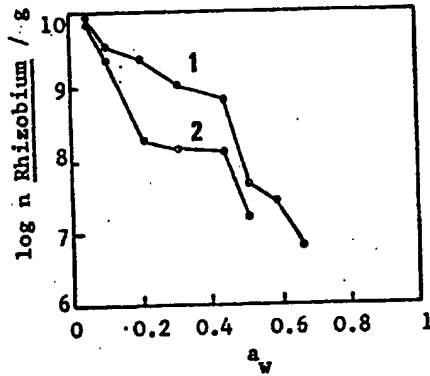


FIG 10

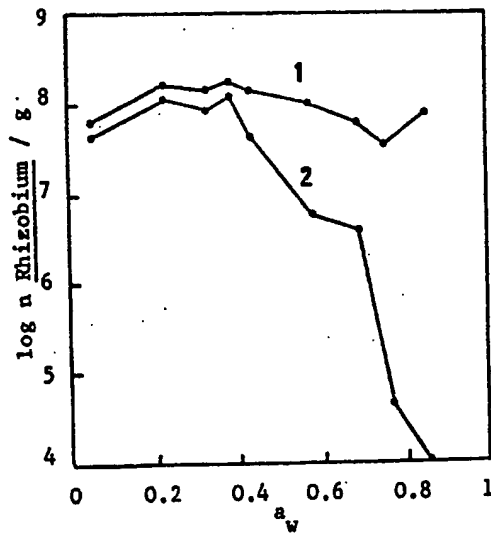


FIG 11

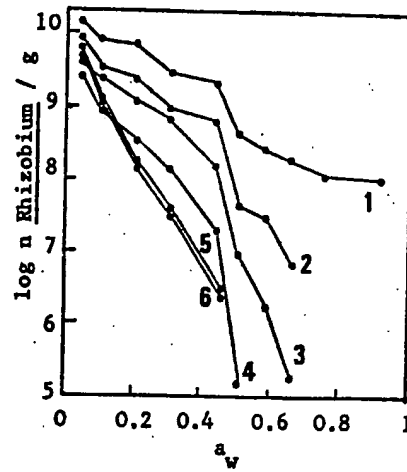
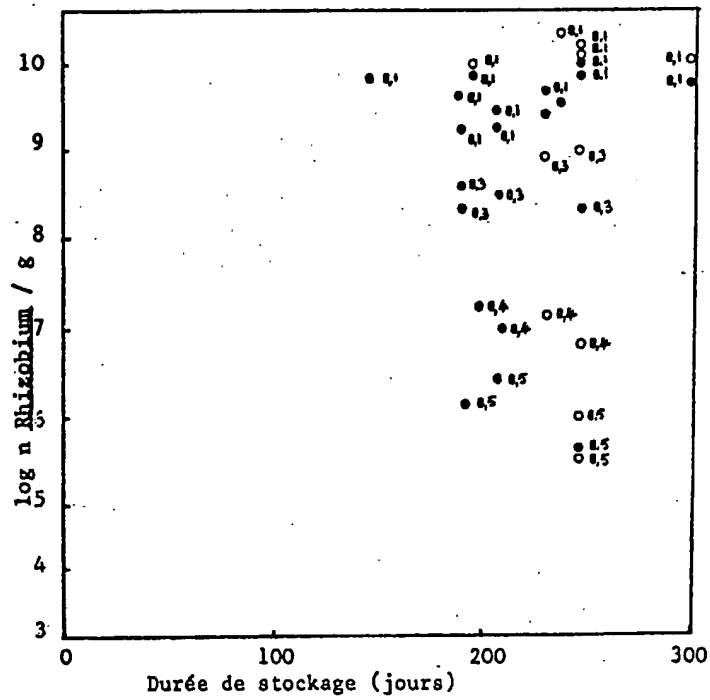


FIG 12



PL 6/7

FIG 13

2519022

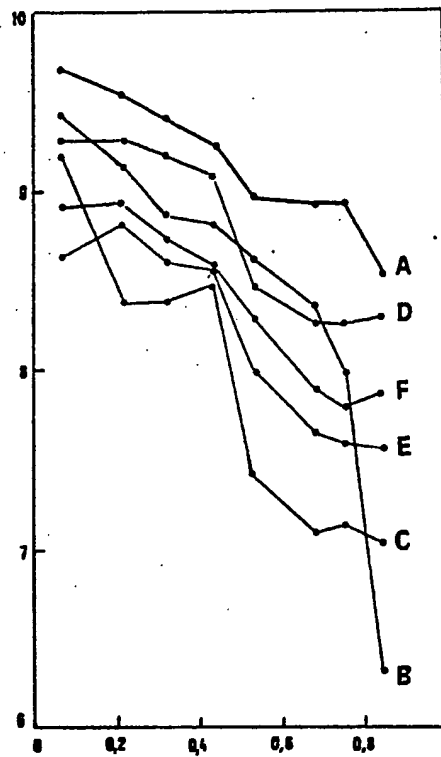


FIG 14

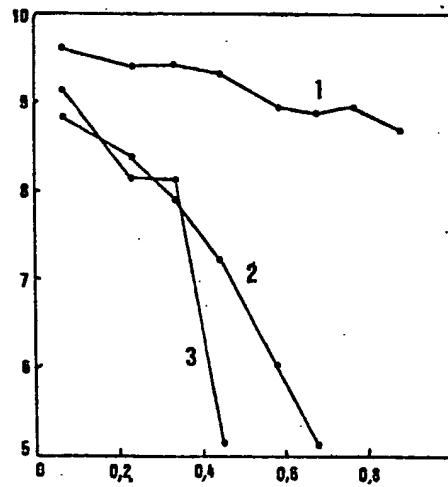
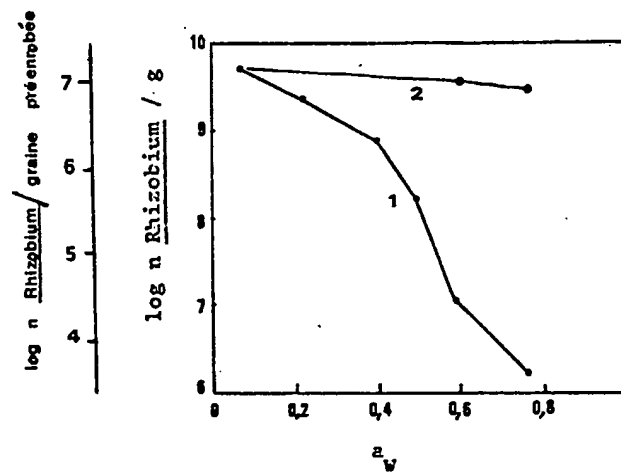


FIG 15



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**